

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

9

(11)Publication number : 08-140670

(43)Date of publication of application : 04.06.1996

(51)Int.Cl. C12N 1/20
C07C 59/01
C12P 7/42
C12P 39/00
C12P 41/00
// (C12N 1/20
C12R 1:425)
(C12N 1/20
C12R 1:06)
(C12N 1/20
C12R 1:01)
(C12P 7/42
C12R 1:425)
C12R 1:06)
(C12P 39/00
C12R 1:06
C12R 1:01)
(C12P 41/00
C12R 1:01)

(21)Application number : 06-307022

(71)Applicant : DAICEL CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 15.11.1994

(72)Inventor : KIMOTO KUNIHIRO

KAWADA NAOKI

NIKAIDO TERUYUKI

(54) MICROORGANISM CAPABLE OF HYDROLYZING NITRILE AND PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE ALPHA-HYDROXYCARBOXYLIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce an optically active α -hydroxycarboxylic acid (leucic acid) of high optical purity by utilizing a microorganism.

CONSTITUTION: An enantiomer mixture of an OH-containing nitrile such as 2-hydroxyisocaprilonitrile is simultaneously or sequentially treated with (1) a microorganism belonging to the genus *Serratia* or *Arthrobacter* capable of hydrolyzing a nitrile to a carboxylic acid and (2) another microorganism capable of acting on an α -hydroxycarboxylic acid (leucic acid) to remain (D)- or (L) enantiomer to obtain an optically active α -hydroxycarboxylic acid. The microorganisms (2a) remaining (D)-enantiomer are *Agrobacterium radiobacter* and *Paracoccus denitrificans*, while those remaining (L)-enantiomer (2b) are *Bordetella bronchiseptica* and *Kluyveromyces marxianus*.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

誌

- (19)【発行国】日本国特許庁(JP)
(12)【公報種別】公開特許公報(A)
(11)【公開番号】特開平8-140670
(43)【公開日】平成8年(1996)6月4日
(54)【発明の名称】ニトリル加水分解能を有する微生物およびそれを用いた光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸の製造方法
(51)【国際特許分類第6版】

C12N 1/20	A 8828-4B
	F 8828-4B
C07C 59/01	9450-4H
C12P 7/42	9548-4B
39/00	9452-4B
41/00	C 9452-4B
// (C12N 1/20	
C12R 1:425)	
(C12N 1/20	
C12R 1:06)	
(C12N 1/20	
C12R 1:01)	
(C12P 7/42	
C12R 1:425	
1:06)	
(C12P 39/00	
C12R 1:06	
1:01)	
(C12P 41/00	
C12R 1:01)	

【審査請求】未請求

【請求項の数】12

【出願形態】FD

【全頁数】12

(21)【出願番号】特願平6-307022

(22)【出願日】平成6年(1994)11月15日

(71)【出願人】

【識別番号】000002901

【氏名又は名称】ダイセル化学工業株式会社

【住所又は居所】大阪府堺市鉄砲町1番地

(72)【発明者】

【氏名】木本 訓弘

【住所又は居所】茨城県つくば市千現1-14-14-401

(72)【発明者】

【氏名】河田 直紀

【住所又は居所】茨城県つくば市千現1-14-14-304

(72)【発明者】

【氏名】二階堂 輝之

【住所又は居所】茨城県つくば市花畑2-13-12-508

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】鍛田 充生 (外1名)

要約

(57)【要約】

【目的】微生物を利用して、光学純度の高い光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸(ロイシン酸など)を効率よく製造する。

【構成】2-ヒドロキシイソカプロニトリルなどのOH基含有ニトリルのエナンチオマー混合物に、セ

ラチア(*Serratia*)属又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成せる能力を有する微生物(1)と、 α -ヒドロキシカルボン酸(ロイシン酸など)のエナンチオマー混合物に作用し、(D)-又は(L)-体を残存させる能力を有する微生物(2)とを同時又は逐次作用させ、残存する光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸を得る。(D)-体を残存させる微生物(2a)は、アグロバクテリウム ラディオバクター(*Agrobacterium radiobacter*)、パラコッカス デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*)であり、(L)-体を残存させる微生物(2b)は、ボルデテラ ブロンチセプチカ(*Bordetella bronchiseptica*)、クライベロマイセス マルキシアナス(*Kluyveromyces marxianus*)である。

請求の範囲

【特許請求の範囲】

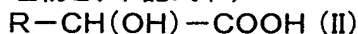
【請求項1】セラチア(*Serratia*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物。

【請求項2】微生物が、セラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*) NH-14 (FERM P-14563)である請求項1記載のニトリル加水分解能を有する微生物。

【請求項3】アルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、2-ヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解してロイシン酸を生成させる能力を有する微生物。

【請求項4】微生物が、アルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacteroxydans*) NH-27 (FERM P-14562)である請求項3記載のニトリル加水分解能を有する微生物。

【請求項5】下記式 (I) $R-CH(OH)-CN$ (I) (式中、Rは炭素数1~20の直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を示す)で表されるニトリル化合物のエナンチオマー混合物に、セラチア(*Serratia*)属に属し、かつニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)又はその処理物と、下記式 (II)



(式中、Rは前記に同じ)で表される化合物又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)-又は(L)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2)又はその処理物とを作用させ、残存する(D)-又は(L)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を得る光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

【請求項6】Rが炭素数1~10であるニトリル化合物のエナンチオマー混合物に、微生物(1a)又はその処理物と、微生物(2)又はその処理物とを作用させる請求項5記載の光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

【請求項7】式 (I)で表されるニトリル化合物のエナンチオマー混合物に、微生物(1a)又はその処理物と、微生物(2)又はその処理物とを、同時又は逐次作用させる請求項5又は6記載の光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸の製造方法。

【請求項8】2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物に、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、2-ヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解してロイシン酸を生成させる能力を有する微生物(1b)若しくはその処理物と、ロイシン酸又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)-又は(L)-ロイシン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2)又はその処理物とを作用させ、残存する(D)-又は(L)-ロイシン酸若しくはその塩を得る光学活性ロイシン酸の製造方法。

【請求項9】セラチア(*Serratia*)属又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)(1b)又はその処理物と、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属又はパラコッカス(*Paracoccus*)属に属し、ロイシン酸又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)-ロイシン酸又はその塩を残存させる能力を有する微生物(2a)又はその処理物とを、2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する(D)-ロイシン酸又はその塩を得る請求項8記載の光学活性ロイシン酸の製造方法。

【請求項10】セラチア(*Serratia*)属又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)(1b)又はその処理物と、ボルデテラ(*Bordetella*)属又はクライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属に属し、ロイシン酸又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(L)-ロイシン酸又はその塩を残存させる能力を有する微生物(2b)又はその処理物とを、2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する(L)-ロイシン酸又はその塩を得る請求項8記載の光学活性ロイシン酸の製造方法。

【請求項11】微生物(2a)が、アグロバクテリウム ラディオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) I

FO 12664又はパラコッカス デニトリフィカンス(Paracoccus denitrificans)IFO 12442である請求項9記載の光学活性ロイシン酸の製造方法。
【請求項12】微生物(26)が、ボルデテラ ブロンチセプチカ(Bordetella bronchiseptica)IFO 13691又はクライベロマイセス マルキシアナス(Kluyveromyces marxianus) IFO 0288である請求項10記載の光学活性ロイシン酸の製造方法。

詳細な説明

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ニトリル化合物を対応するカルボン酸に変換する上で有用な微生物、この微生物を用い、種々の医薬・農薬、例えば、抗リュウマチ剤の合成原料として有用な光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸の製造方法について種々の方法が提案されている。例えば、光学活性ロイシン酸を製造する方法として、(1)2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物にトルロプシス キャンディダ GN405を作用させ、(L)-ロイシン酸を製造する方法(J. Jermont. Technol. 51巻, 6号, P393-397, 1973)が知られている。しかし、この方法(1)では、生成する(L)-ロイシン酸の濃度が0.24g/L程度と非常に低く、工業的には実用性の点で難点がある。

【0003】特開昭54-26397号公報には、ストレプトミセス属、バチルス属、シュードモナス属、コリネフォルム群に属し、かつ立体特異的脱水素酵素活性を有する微生物を、 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、ロイシン酸)のエナンチオマー混合物に作用させ、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、光学活性ロイシン酸)を製造する方法が提案されている。しかし、この方法(2)により光学活性ロイシン酸を得る場合には、高価な原料であるロイシン酸のエナンチオマー混合物を使用する必要があり、工業的に不利である。

【0004】特開昭63-150256号公報には、光学活性酒石酸誘導体のチタン酸エステルが存在下、アルデヒドにシアノ化剤を作用させ、不斉的にシアノ化し、光学活性シアノヒドリンを得る方法が開示されている。この文献には、イソバレルアルデヒドから不斉シアノ化反応により光学活性2-ヒドロキシイソカプロニトリルを生成させ、生成した2-ヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解し、(L)-ロイシン酸を製造する方法も記載されている。しかし、この方法(3)は、操作が繁雑であるだけでなく、得られた(L)-ロイシン酸の光学純度が77%eeと低い。

【0005】さらに、(4)2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物を加水分解してロイシン酸のエナンチオマー混合物を生成させ、光学活性な光学分割剤を用いて光学分割する方法なども知られている。しかし、この方法(4)は、光学分割剤の合成が困難であるとともに高価な光学分割剤を必要とし、工業的レベルでの製造が容易でない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、ニトリルを高い効率で加水分解し、カルボン酸を生成させる微生物を提供することにある。

【0007】本発明の他の目的は、2-ヒドロキシイソカプロニトリルを有効に加水分解し、対応するロイシン酸を生成させる微生物を提供することにある。

【0008】本発明のさらに他の目的は、ニトリル加水分解能が高く、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を効率よく安価に製造する上で有用な微生物を提供することにある。

【0009】本発明の他の目的は、光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を効率よく安価に製造できる方法を提供することにある。本発明の別の目的は、簡単な操作で光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を製造できる方法を提供することにある。

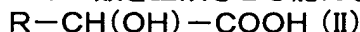
【0010】本発明のさらに別の目的は、高いニトリル加水分解能を有する微生物又はその処理物を利用して、光学純度の高い光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を高い収率で得ることができる方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、経済性に優れ、かつ簡便な方法で光学純度の高い光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸を高収率で得る方法として2種類の微生物を作用させる方法に着目し、鋭意検討を重ねた。その結果、■ニトリル化合物に、特定の特定の微生物群から選ばれた微生物又はその処理物を作用させると、極めて高い効率でニトリル加水分解反応が生じること、■ニトリル化合物(例えば、2-ヒドロキシイソカプロニトリルなど)のエナンチオマー混合物に、前記微生物と、特定の微生物群から選ばれた微生物又はその処理物を、同時に又は逐次に作用させると、対応する光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、(D)

ーロイシン酸又は(L)ーロイシン酸など)が効率よく残存することを見だし、本発明を完成した。
【0012】すなわち、本発明は、セラチア(*Serratia*)属に属し、ニトリル加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物又はその処理物を提供する。このような微生物には、例えば、セラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*)などが含まれる。また、本発明は、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、2ーヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解してロイシン酸を生成させる能力を有する微生物又はその処理物を提供する。このような微生物には、アルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*)などが含まれる。

【0013】本発明の方法では、下記式(I) $R-CH(OH)-CN$ (I) (式中、Rは炭素数1~20の直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を示す)で表されるニトリル化合物のエナンチオマー混合物に、セラチア(*Serratia*)属又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、かつニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)又はその処理物と、下記式(II)



(式中、Rは前記に同じ)又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)ー又は(L)ー α ーヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2)又はその処理物とを作用させ、残存する(D)ー又は(L)ー α ーヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を得ることにより、光学活性 α ーヒドロキシカルボン酸を製造する。

【0014】光学活性 α ーヒドロキシカルボン酸として、例えば、光学活性ロイシン酸を製造する場合、2ーヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物に、セラチア(*Serratia*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物(1a)又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、2ーヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解してロイシン酸を生成させる能力を有する微生物(1b)若しくはその処理物と、ロイシン酸又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)ー又は(L)ーロイシン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2)又はその処理物とを作用させ、残存する(D)ー又は(L)ーロイシン酸若しくはその塩を得ることにより、光学活性ロイシン酸を製造できる。

【0015】前記方法において、前記微生物(2)として、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属又はパラコッカス(*Paracoccus*)属に属し、ロイシン酸又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)ーロイシン酸又はその塩を残存させる能力を有する微生物(2a)又はその処理物を用いることにより、(D)ーロイシン酸又はその塩を得ることができる。また、前記微生物(2)として、ボルデテラ(*Bordetella*)属あるいはクライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属に属し、ロイシン酸のエナンチオマー混合物に作用し、(L)ーロイシン酸又はその塩を残存させる能力を有する微生物(2b)又はその処理物を用いることにより、(L)ーロイシン酸又はその塩を得ることができる。

【0016】これらの方法において、ニトリル化合物のエナンチオマー混合物には、微生物(1a)(1b)又はその処理物と、微生物(2)又はその処理物とを、同時又は逐次作用させてもよい。

【0017】なお、本明細書において、特に断りがない限り、セラチア(*Serratia*)属に属し、ニトリルを加水分解してカルボン酸を生成させる能力を有する微生物を微生物(1a)、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属し、2ーヒドロキシイソカプロニトリルを加水分解してロイシン酸を生成させる能力を有する微生物を微生物(1b)と称し、微生物(1a)及び(1b)を微生物(1)と総称する。

【0018】以下に、本発明を詳細に説明する。

【0019】本発明の微生物(1a)は、セラチア(*Serratia*)属に属する微生物群から選ばれた微生物であって、ニトリルに作用し、加水分解によりカルボン酸に変換する能力を有する限り、その種類は特に制限されない。また、本発明の微生物(1b)は、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属する微生物群から選ばれた微生物であって、2ーヒドロキシイソカプロニトリルに作用して対応するロイシン酸を生成させる能力を有する限り、その種類は特に制限されない。このような微生物(1a)のうちニトリル加水分解能の高い微生物には、セラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*) NH-14 (FERM P-14563)などのセラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*)などが含まれる。微生物(1b)のうちニトリル加水分解能の高い微生物には、アルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*) NH-27 (FERM P-14562)などのアルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*)などが含まれる。

【0020】前記NH-14株及びNH-27株は、本発明者らが新潟県の土壌より分離した新規な菌株であり、高いニトリル加水分解能を有する。そのため、上記微生物は、ニトリル類(例えば、2ーヒドロキシイソカプロニトリルなど)を高い変換率で加水分解し、対応するカルボキシル基を有する化合物(例えば、ロイシン酸など)に変換する上で有用である。これらの菌株は、工業技術院 生命工学工業技術研究所に上記番号にて寄託されている。以下に、これらの菌株の菌学的性質を示す。

【0021】

【NH-14株の菌学的性質】

(a)形態 (1)細胞の形及び大きさ 桿菌 0.8~1.0 μ m \times 1.0~2.5 μ m (2)細胞の多形性の

有無なし(3)運動性－(4)胞子の有無－(6)抗酸性－(b)培養的性質(1)肉汁寒天平板培養不透明でクリーム色のコロニーを形成する(2)肉汁液体培養培養全体で良く生育する(c)生理学的性質(1)グラム染色性－(2)硝酸塩の還元＋(3)オキシダーゼ－(4)カタラーゼ＋(5)アミノペプチダーゼ＋(6)インドールの生成－(7)MRテスト＋(8)VPテスト＋(9)ウレアーゼ－(10)フェニルアラニンデアミナーゼ＋(11)シュークロースからレバンの生成＋(12)ゼラチンの加水分解＋(13)DNAの加水分解＋(14)Tween80の加水分解＋(15)3% KOHによる溶菌＋(16)酸素に対する態度 通性嫌氣的(17)クエン酸の資化(シモンズの培地)＋(18)OFテスト F(19)4℃での生育＋(20)40℃での生育－(21)色素の生成－(22)酸の生成 グルコース＋フルクトース＋キシロース＋シュークロース＋アラビノース＋マンノース＋トレハロース＋(23)PNPG(β-ガラクトシダーゼ)＋(24)アルコールデヒドロゲナーゼ－(25)リジンデカルボキシラーゼ－(26)オルニチンデカルボキシラーゼ－(27)硫化水素の発生－[NH-27株の菌学的性質]

(a)形態(1)細胞の形 コリネフォルム桿菌(2)細胞の多形性の有無 有り 桿菌と球菌の生育サイクルを繰り返す(3)運動性－(4)胞子の有無－(b)培養的性質(1)肉汁寒天平板培養 透明でクリーム色のコロニーで円形であり、周縁部は円滑または波状である(2)肉汁液体培養 液表面での生育は良好で膜状であり、液中で良く濁っている。また、底部に沈殿物が見られる(c)生理学的性質(1)グラム染色性＋(2)硝酸塩の還元＋(3)MRテスト－(4)VPテスト－(5)インドールの生成－(6)硫化水素の生成－(7)デンプンの加水分解＋(8)クエン酸の資化(シモンズの培地)＋(9)無機窒素源(アンモニウム塩)の利用＋(10)カタラーゼ＋(12)酸素に対する態度 好氣的(13)OFテスト O(14)酸の生成 グルコース－(15)細胞加水分解物中のメソジアミノピメリン酸－(16)細胞壁タイプ A3α, L-Lys-L-Ser-L-Thy-L-Ala以上の菌学的性質をバージーの細菌分類書[Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986)]に基づいて分類すると、NH-14株はセラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*)と同定された。また、NH-27株はアルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*)と同定された。

【0022】前記微生物(1a)は、例えば、脂肪族ニトリル、芳香族ニトリル、複素環式ニトリルなどの種々のニトリル化合物の加水分解反応に利用できる。脂肪族ニトリルには、例えば、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレロニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリル、エナントニトリル、カプリロニトリル、カプリニトリル、ラウロニトリルの飽和脂肪族ニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、クロトンニトリルなどの不飽和脂肪族ニトリルなどの脂肪族ニトリル；マロンニトリル、スクシノニトリル、グルタルニトリル、アジポニトリルなどの脂肪族ジニトリルなどが含まれる。

【0023】芳香族ニトリルには、例えば、ベンゾニトリル、クロロベンゾニトリル、フルオロベンゾニトリルなどの o -, m -および p -ハロベンゾニトリル、ニトロベンゾニトリル、 p -アミノベンゾニトリル、4-シアノフェノール、トルニトリル、アニソニトリル、 α -ナフトニトリル、 β -ナフトニトリル、シアニ化ベンジルなどの芳香族モノニトリル類；フタロニトリル、イソフタロニトリル、テレフタロニトリルなどの芳香族ジニトリルなどが含まれる。

【0024】複素環式ニトリルには、例えば、2-チオフェンカルボニトリル、2-フロニトリル、2-シアノピリジン、3-シアノピリジン、4-シアノピリジン、シアノピラジン、4-シアノピペリジンなどのシアノピペリジン、シアノピペラジン、5-シアノインドールなどが含まれる。

【0025】前記微生物(1a)は、前記ニトリル化合物のうち下記式(I)R-CH(OH)-CN(I)(式中、Rは直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を示す)で表される α -ヒドロキシニトリル類などのヒドロキシニトリル類を有効に加水分解し、対応するヒドロキシカルボン酸を生成させる。また、微生物(1b)は2-ヒドロキシイソカプロニトリルを高い効率で加水分解し、対応するロイシン酸を生成させる。そのため、前記微生物(1)は、2-ヒドロキシイソカプロニトリルなどのヒドロキシニトリル類に作用させ、ロイシン酸などのヒドロキシカルボン酸を効率よく生成させる上で有用である。

【0026】前記式(I)において、Rで表されるアルキル基には、炭素数1~20程度の直鎖状又は分岐鎖状アルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 s -ブチル、 t -ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、オクチル、2-エチルヘキシル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル基などが例示される。好ましいアルキル基には、炭素数1~10程度、特に1~6程度(例えば、炭素数2~5程度)の直鎖状又は分岐鎖状アルキル基が含まれる。

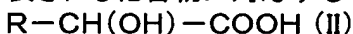
【0027】前記式(I)で表される α -ヒドロキシニトリル類のうち、代表的な化合物には、例えば、2-ヒドロキシプロピオニトリル、2-ヒドロキシブチロニトリル、2-ヒドロキシイソブチロニトリル、2-ヒドロキシバレロニトリル、2-ヒドロキシイソバレロニトリル、2-ヒドロキシピバロニトリル、2-ヒドロキシカプロニトリル(2-ヒドロキシヘキサニトリル)、2-ヒドロキシイソカプロニトリル(2-ヒドロキシイソヘキサニトリル)、2-ヒドロキシヘプタニトリル、2-ヒドロキシイソヘプタニトリル、2-ヒドロキシオクタニトリル、2-ヒドロキシイソオクタニトリル、2-ヒドロキシラウロニトリル

ル、2-ヒドロキシミリスチノトリル、2-ヒドロキシパルミトトリルなどが含まれる。

【0028】本発明の方法は、機能の異なる2種類の微生物又はその処理物を有効に組合せることにより、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、光学活性ロイシン酸)を効率よく製造する点にある。すなわち、前記式(I)で表される化合物のエナンチオマー混合物に、下記微生物(1a)(1b)又はその処理物と、下記微生物(2)又はその処理物とを組合せて作用させ、残存する(D)-又は(L)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を得ることにより、光学純度の高い光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を高い収率で製造できる。

【0029】前記微生物(1a)(1b)としては、前記のトリルを加水分解して対応するカルボン酸を生成させる能力を有し、セラチア(*Serratia*)属又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属する微生物、特に、微生物(1a)の範疇に属するNH-14株などのセラチア プリムシカ(*Serratia plymuthica*)、微生物(1b)の範疇に属するNH-27株などのアルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*)などが使用される。

【0030】前記式(I)で表される化合物に微生物(1)又はその処理物を作用させると、前記式(I)で表される化合物に対応する下記式(II)



(式中、Rは前記に同じ)で表される α -ヒドロキシカルボン酸が生成する。ただし、微生物(1b)は前記式(I)においてRがイソブチル基、すなわち2-ヒドロキシイソカプロトリルに適用される。

【0031】式(II)で表される化合物の具体例としては、例えば、2-ヒドロキシプロピオン酸、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸、2-ヒドロキシ-3, 3-ジメチル酪酸、2-ヒドロキシヘプチル酸、2-ヒドロキシ-4-メチルカプロン酸、2-ヒドロキシカプリル酸、2-ヒドロキシペラルゴン酸、2-ヒドロキシカプリン酸、2-ヒドロキシウンデカン酸、2-ヒドロキシラウリン酸、2-ヒドロキシトリデカン酸、2-ヒドロキシテトラデカン酸、2-ヒドロキシペンタデカン酸などが挙げられる。

【0032】前記式(II)で表される化合物又はその塩から光学活性体を得るため、前記微生物(2)には、前記式(II)で表される化合物又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)-又は(L)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を残存させる能力(不斉還元能)を有する微生物が含まれる。

【0033】式(II)で表される化合物の塩には、無機塩基(例えば、リチウム、カリウム、ナトリウムなどのアルカリ金属、アンモニアなど)、有機塩基(例えば、モノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどの脂肪族アミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンなどのアルカノールアミン、ピリジン、モルホリンなど複素環式アミンなど)との塩が含まれる。

【0034】前記微生物(2)は、前記式(II)で表される化合物又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2a)と、前記式(II)で表される化合物又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(L)- α -ヒドロキシカルボン酸若しくはその塩を残存させる能力を有する微生物(2b)とに大別される。

【0035】微生物(2a)には、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属及びパラコッカス(*Paracoccus*)属に属する微生物群から選ばれた微生物であって、 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、ロイシン酸など)又は塩のエナンチオマー混合物に作用し、(D)- α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、(D)-ロイシン酸など)又は塩を残存する能力を有する微生物であればよい。このような微生物(2a)には、例えば、アグロバクテリウム ラジオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) IFO 12664などのアグロバクテリウム ラジオバクター、パラコッカス デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*) IFO 12442などのパラコッカス デニトリフィカンスなどが含まれる。

【0036】微生物(2b)は、ボルデテラ(*Bordetella*)属、クライペロマイセス(*Kluyveromyces*)属に属する微生物群から選ばれた微生物であって、 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、ロイシン酸など)又はその塩のエナンチオマー混合物に作用し、(L)- α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、(L)-ロイシン酸など)又はその塩を残存する能力を有する微生物であればよい。このような微生物(2b)には、例えば、ボルデテラ ブロンチセプチカ(*Bordetella bronchiseptica*) IFO 13691などのボルデテラ ブロンチセプチカ、クライペロマイセス マルキシアナス(*Kluyveromyces marxianus*) IFO 0288などのクライペロマイセス マルキシアナスなどが含まれる。

【0037】なお、IFOが付された微生物は、(財)発酵研究所発行の微生物カタログ、第9版(1992)に記載されており、該IFOから入手することができる。

【0038】これらの微生物は、野生株、変異株、または細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝子的手法により誘導される組み換え株など、いずれの株でも好適に用いることができる。

【0039】本発明の好ましい態様では、前記式(I)においてRが炭素数2~6程度の化合物(例えば、Rが炭素数3~5程度の化合物、特に2-ヒドロキシイソカプロトリルなど)のエナンチオマー混合物に、前記微生物(1a)(1b)又はその処理物と、前記微生物(2a)又はその処理物とを作用

させ、残存する(D)- α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩(特に、(D)-ロイシン酸又はその塩)を得ることにより光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸を製造できる。また、前記微生物(2a)又はその処理物に代えて、前記微生物(2b)又はその処理物を、前記式(I)においてRが炭素数2~6程度の化合物(例えば、Rが炭素数3~5程度の化合物、特に2-ヒドロキシイソカプロニトリルなど)のエナンチオマー混合物に作用させ、残存する(L)- α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩(特に、(L)-ロイシン酸)又はその塩を得ることにより、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸を製造できる。

【0040】特に好ましい態様では、2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物に、微生物(1a)(1b)又はその処理物と、微生物(2)又はその処理物とを、同時又は逐次作用させ、残存する(D)-又は(L)-ロイシン酸若しくはその塩を得ることにより、光学活性ロイシン酸を製造する。

【0041】なお、2-ヒドロキシイソカプロニトリルのエナンチオマー混合物は、例えば、イソバレルニトリルから容易に合成することができる(J. Ferment. Technol., 51巻, 6号, P393-397, (1973))。

【0042】本発明の方法には、種々の態様が含まれ、式(I)で表されるニトリル化合物に、機能の異なる2つの前記微生物、その処理物または微生物から分離した酵素を作用させ、残存する光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸またはその塩を生成させればよい。また、微生物(1a)(1b)、微生物(2a)又は微生物(2b)を用いる反応において、微生物(1)の培養液をそのまま用い、培養液にニトリル化合物(例えば、2-ヒドロキシイソカプロニトリルなど)のエナンチオマー混合物を添加する方法、遠心分離などにより分離した菌体をそのまま、又は洗浄した菌体、緩衝液、水などに再懸濁した菌体に、ニトリル化合物(2-ヒドロキシイソカプロニトリルなど)のエナンチオマー混合物を添加して反応させてもよい。本発明の具体的な方法には、例えば、次のような方法が含まれる。

【0043】(A)式(I)で表されるニトリル化合物の存在下に微生物(1)と微生物(2)とを培養する方法、(B)微生物(1)の培養液と微生物(2)の培養液とを、前記ニトリル化合物に作用させる方法、(C)培養液から採取した微生物(1)と微生物(2)とを、前記ニトリル化合物に作用させる方法、(D)培養した微生物(1)と微生物(2)の処理物、例えば菌体の破碎物で、前記ニトリル化合物を処理する方法、(E)培養した微生物(1)(2)又はそれらの処理物を担体に固定し、ニトリルを加水分解する方法など。

【0044】前記微生物(1)又はその処理物と、前記微生物(2)又はその処理物は、前記式(I)で表されるニトリル化合物に同時又は逐次作用させてもよい。本発明において前記2種類の微生物(1)(2)又はそれらの処理物を同時に作用させると、操作が簡単であるだけでなく、2種類の微生物(1)(2)のうち一方の微生物又はその処理物が、他方の微生物又はその処理物の活性を低下させることも少ない。

【0045】好ましい方法においては、微生物(1a)又は(1b)と微生物(2a)又は微生物(2b)とを式(I)で表されるニトリル化合物に同時に作用させる方法(すなわち、微生物(1a)又は(1b)と微生物(2a)又は微生物(2b)との共存下、ニトリル化合物の加水分解反応と、生成した α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩の不斉資化を行なう方法)、微生物(1a)又は(1b)により α -ヒドロキシカルボン酸のエナンチオマー混合物又はその塩を生成させた後、微生物(2a)又は微生物(2b)を添加して反応させる場合が多い。

【0046】なお、微生物(1)の活性を利用してニトリル化合物を α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、ロイシン酸など)のエナンチオマー混合物に変換させた後、微生物(2a)又は微生物(2b)を添加して反応させる場合、微生物(1)のニトリル加水分解反応により生成した α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、ロイシン酸など)のエナンチオマー混合物は、単離精製などにより採取することなく、光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸(例えば、光学活性ロイシン酸)の製造に利用される。

【0047】菌体は生菌体のまま用いてもよく、菌体破碎物、アセトン処理、トルエン処理、凍結乾燥などの処理を施した処理物として用いてもよい。なお、処理物には、前記微生物から単離された酵素も含まれる。なお、微生物の培養液からの菌体の採取は、慣用の方法、例えば、遠心分離法などで行なうことができる。また、菌体の破碎は、例えば、ホモジナイザーなどの機械的手段だけでなく、超音波などを利用して行なうことができる。

【0048】前記微生物(1)(2)を培養するための培地は、前記微生物が増殖し得る限り特に制限されないが、炭素源及び/又は窒素源を含む場合が多い。炭素源は、上記微生物が利用可能であればよく、例えば、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリン、デンプンなどの糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類およびその塩類、パラフィンなどの炭化水素類などが含まれる。これらの炭素源は一種又は二種以上混合して使用できる。窒素源としては、例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機酸のアンモニウム塩(無機含窒素化合物)、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、尿素など

の有機含窒素化合物などが挙げられる。これらの窒素源も一種又は二種以上混合して使用できる。

【0049】微生物(1)の培養に際しては、前記種々のニトリル化合物、例えば、イソバレロニトリル、イソブチロニトリル、*n*-ブチロニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル化合物を含む培地を利用してもよい。これらのニトリル化合物も一種又は二種以上使用できる。さらに、培地は、微生物の培養に慣用される栄養源、例えば、リン酸塩などの無機塩、ナトリウム、カリウム、鉄、マグネシウム、マンガン、亜鉛、コバルトなどの無機栄養源(微量金属塩)、ビオチン、チアミンなどのビタミン類などを適宜含有していてもよい。また、必要に応じて、微生物の増殖を促進する因子、又は培地のpH保持に有効な炭酸カルシウムなどの緩衝性物質も添加できる。

【0050】培養は、例えば、培地のpH3.0～9.5、好ましくは4.0～8.0程度、培養温度20～45℃、好ましくは25～40℃程度で、嫌氣的又は好氣的に行なうことができる。培養時間は、微生物の生育に適した条件下、例えば、5～120時間、好ましくは12～72時間程度である場合が多い。

【0051】反応に際して、式(I)表されるニトリル化合物(2-ヒドロキシイソカプロニトリルなど)のエナンチオマー混合物はそのまま反応に供してもよく、反応に悪影響を及ぼさない溶媒、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液などの緩衝液、アルコールなどの有機溶媒と水との混液に、溶解又は分散して反応に供してもよい。また、前記ニトリル化合物は、界面活性剤などに溶媒に分散させて反応に供してもよい。さらに、前記ニトリル化合物は、反応系に一括して添加してもよく、分割して添加してもよい。

【0052】反応系において、基質であるニトリル化合物のエナンチオマー混合物の濃度は特に限定されず、例えば、0.2～5重量%、好ましくは0.5～3重量%程度である場合が多い。反応系の微生物菌体または菌体処理物の濃度は、通常、0.1～10重量%程度の範囲から選択できる。

【0053】反応は、微生物又はその処理物の活性を損わない条件、例えば、pH=3.0～10.0、好ましくはpH=5.0～9.0程度、温度5～60℃、好ましくは20～40℃程度の範囲で、1～120時間程度、攪拌下又は静置下で行なうことができる。

【0054】必要に応じて、前記緩衝液、または塩基(例えば、アンモニア、水酸化ナトリウム、炭酸カルシウムなど)や酸(例えば、塩酸、硫酸など)により反応液のpHを維持すると、良好な結果が得られる場合もある。

【0055】このようにして生成した光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩は、慣用の方法により分離精製できる。例えば、反応液を、直接、膜分離、有機溶媒による抽出、減圧濃縮、カラムクロマトグラフィー、晶析などの方法やこれらの方法を組合せた分離手段に供したり、遠心分離、膜分離などにより反応液から菌体を除去した後、前記分離手段に供する方法などにより、目的化合物であるアミドを分離することができる。なお、分離精製に際しては、任意の段階で、活性炭、イオン交換樹脂などで処理して着色物質、不純物などを除去してもよい。

【0056】

【発明の効果】本発明の微生物は、ニトリルを高い効率で加水分解し、カルボン酸を生成する。また、本発明の他の微生物は、2-ヒドロキシイソカプロニトリルからロイシン酸を高い効率で生成させる。そのため、ヒドロキシル基を有するニトリル化合物からヒドロキシカルボン酸を効率よく生成できる。

【0057】本発明の方法では、異質の活性を有する2つの微生物又はその処理物を、ヒドロキシル基を有するニトリル化合物に同時又は逐次作用させるので、光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を効率よく安価に製造できる。また、2種類の微生物を用いるという簡単な操作で光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を製造できる。さらに、高いニトリル加水分解能を有する微生物又はその処理物を利用して、光学純度の高い光学活性ロイシン酸などの光学活性 α -ヒドロキシカルボン酸又はその塩を高い収率で得ることができる。

【0058】

【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0059】なお、実施例における反応液中の2-ヒドロキシイソカプロニトリル及びロイシン酸の定量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC、カラム:Ionpak KC-811(昭和電工(株)製)、 ϕ 8mm×300mm、移動相:0.1%リン酸水溶液、流速:1.0ml/分、温度:40℃、検出:示差屈折)を利用して行なった。また、ロイシン酸の光学純度は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC、カラム:キラルパック(Chiralpak)MA(+)(ダイセル化学工業(株)製)、 ϕ 4.6mm×50mm、移動相:2mM硫酸銅水溶液/アセトニトリル[95/5%(V/V)]、流速:0.5ml/分、温度:40℃、検出:UV254nm)を利用して測定した。また、実施例では下記組成の菌体調製用培地A～Cを用いて菌体を培養した。

【0060】＜菌体調製用培地A＞グリセルロール 1. 0%イソバレロニトリル 0. 2%酵母エキス 0. 02% KH_2PO_4 0. 05% NaCl 0. 1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 02% $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10ppm $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1ppm $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7ppm pH=7. 2 ＜菌体調製用培地B＞乾燥ブイオン「ニッスイ」(日水製薬(株)製) 3% pH=7. 2 ＜菌体調製用培地C＞グルコース 2. 0%麦芽エキス 0. 3%酵母エキス 0. 3%ポリペプトン 0. 3% pH=6. 0 実施例1 菌体調製用培地A 600mlを小型培養槽(丸菱バイオエンジニアリング社製、容積1リットル)に仕込み、121℃、15分間滅菌し冷却した。一方、アルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*) NH-27株を菌体調製用培地Bを用いて、30℃で、24時間振盪培養(5ml/φ21mm試験管 2本)した。滅菌した上記培地Aに、得られた菌体培養液6mlを無菌的に接種し、30℃、600rpm、1. 0vvmの条件で培養した。

【0061】培養液から50mlを分取し、冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。生菌体を、2%(w/v)の2-ヒドロキシイソカプロニトリルを含む100mMリン酸緩衝液(pH=7. 0)50mlに懸濁させた。この菌体懸濁液を坂口フラスコ(容積500ml)に入れ、30℃で24時間反応させた(反応混合液1)。

【0062】反応終了後、反応混合液2mlを、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液に残存している2-ヒドロキシイソカプロニトリルと変換されたロイシン酸とを定量したところ、2-ヒドロキシイソカプロニトリルは残存せず(残存濃度0. 0g/L)、ロイシン酸の生成量15. 3g/Lであった。なお、変換されたロイシン酸はラセミ体であった。

【0063】次いで、4種類の菌株をそれぞれ培養した。すなわち、■アグロバクテリウムラディオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) IFO 12664、■パラコッカス デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*) IFO 12442、■ボルデテラ ブロンチセプチカ(*Bordetella bronchiseptica*) IFO 13691については菌体調製用培地Bを用いて、■クライペロマイセス マルキシアナス

(*Kluyveromyces marxianus*) IFO 0288については菌体調整用培地Cを用いて、それぞれ、30℃で24時間振盪培養(5ml/φ21mm試験管 各2本)した。得られた各培養液を冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。pH8. 0に調整した反応混合液1 5mlにそれぞれの生菌体を懸濁させ、菌体懸濁液をφ21mm試験管に入れ、さらに30℃で48時間反応させた。

【0064】反応終了後、遠心分離にて除菌した上澄液のロイシン酸濃度および光学純度を測定したところ、表1に示す結果を得た。

【0065】

【表1】

表 1

	ロイシン酸 の 残 存 量 (g/L)	ロイシン酸 の光学純度 (%ee)	絶対配置
アグロバクテリウム ラディオ バクター IFO 12664	5. 1	100. 0	D
パラコッカス デニトリフィ カンス IFO 12442	1. 0	100. 0	D
ボルデテラ ブロンチセプチカ IFO 13691	1. 8	51. 8	L
クライペロマイセス マルキシ アナス IFO 0288	4. 2	78. 1	L

実施例2 実施例1で得られたアルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*) NH-27の培養液50mlを、冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。生菌体を2%(w/v)の2-ヒドロキシイソカプロニトリルを含む100mMリン酸緩衝液(pH=7. 5)50mlに懸濁させ、菌体懸濁液を坂口フラスコ(容積500ml)に入れ、30℃で24時間反応させた(反応混合液2)。

【0066】反応終了後、2mlの反応混合液を、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液に残存している2-ヒドロキシイソカプロニトリルと変換されたロイシン酸とを定量したところ、2-ヒドロキシイソカプロニトリルは残存せず(残存濃度0. 0g/L)、ロイシン酸の生成量16. 0g/Lであった。なお、変換されたロイシン酸はラセミ体であった。

【0067】次いで、4種類の菌株をそれぞれ培養した。すなわち、■アグロバクテリウムラディオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) IFO 12664、■パラコッカス デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*) IFO 12442、■ボルデテラ ブロンチセプチカ(*Bordetella bronchiseptica*) IFO 13691については菌体調製用培地Bを用いて、■クライベロマイセス マルキシアナス(*Kluyveromyces marxianus*) IFO 0288については菌体調整用培地Cを用いて、それぞれ、30°Cで24時間振盪培養(5ml/φ21mm試験管 各2本)した。得られた各培養液を冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。pH8.0に調整した反応混合液1.5mlにそれぞれの生菌体を懸濁させ、菌体懸濁液をφ21mm試験管に入れ、さらに30°Cで48時間反応させた。

【0068】反応終了後、遠心分離にて除菌した上澄液のロイシン酸濃度および光学純度を測定したところ、表2に示す結果を得た。

【0069】

【表2】

表 2

	ロイシン酸 の残存量 (g/L)	ロイシン酸 の光学純度 (%ee)	絶対配置
アグロバクテリウム ラディオ バクター IFO 12664	5.4	100.0	D
パラコッカス デニトリフィ カンス IFO 12442	1.2	100.0	D
ボルデテラ ブロンチセプチカ IFO 13691	2.0	49.9	L
クライベロマイセス マルキシ アナス IFO 0288	4.6	65.3	L

実施例3実施例1で得られたアルスロバクター オキシダンス(*Arthrobacter oxydans*) NH-27の培養液10mlを、冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。生菌体を、1%(w/v)の2-ヒドロキシイソカプロニトリルを含む100mMリン酸緩衝液(pH=7.0)10mlに懸濁させた。

【0070】さらにアグロバクテリウム ラディオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) IFO 12664を菌体調製用培地Bを用いて30°Cで24時間振盪培養(5ml/φ21mm試験管 2本)し、得られた培養液を冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。

【0071】その生菌体をNH-27を懸濁させた液5mlに懸濁させた。該菌体懸濁液5mlをφ21mm試験管に入れ、30°Cで24時間反応させた。

【0072】反応終了後、遠心分離にて除菌した上澄液に残存する2-ヒドロキシイソカプロニトリルとロイシン酸の定量および光学純度を測定したところ、2-ヒドロキシイソカプロニトリルは残存せず(残存濃度0.0g/L)、光学純度100%eeの(D)-ロイシン酸が濃度3.6g/Lで残存していた。

【0073】実施例4菌体調製用培地A 600mlを小型培養槽(丸菱バイオエンジニアリング社製、容積1リットル)に仕込み、121°Cで15分間滅菌し冷却した。一方、セラチア プリムシア(*Serratia plymuthia*) NH-14株を菌体調製用培地Bを用いて、30°Cで、24時間振盪培養(5ml/φ21mm試験管 2本)した。滅菌した上記培地Aに、得られた菌体培養液6mlを無菌的に接種し、30°C、600rpm、1.0vvmの条件で24時間培養した。

【0074】培養液を冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。生菌体を0.5%(w/v)の2-ヒドロキシイソカプロニトリルを含む100mMリン酸緩衝液(pH=7.0)600mlに懸濁させた。この菌体懸濁液を前記小型培養槽で、30°C、600rpm、1.0vvmの条件下で24時間反応させた(反応混合液3)。

【0075】反応終了後、2mlの反応混合液3を、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液に残存している2-ヒドロキシイソカプロニトリルと変換されたロイシン酸とを定量したところ、2-ヒドロキシイソカプロニトリルは残存せず(残存濃度0.0g/L)、ロイシン酸の生成量4.8g/Lであった。なお、変換されたロイシン酸はラセミ体であった。

【0076】次いで、菌体調製用培地B 600mlを前記小型培養槽に仕込み、121°Cで15分間滅菌

し冷却した。一方、アグロバクテリウム ラディオバクター (*Agrobacterium radiobacter*) IFO 12664 を菌体調製用培地Bに置いて30℃で24時間振盪培養(5ml/φ25mm試験管2本)した。滅菌した上記培地Bに、得られた菌体培養液6mlを無菌的に接種し、30℃、600rpm、1.0vvmの条件で20時間培養した。得られた培養液を冷却しながら遠心分離で菌体を分離し、得られた生菌体を反応混合液3に懸濁させた。この菌体懸濁液を前記小型培養槽で、30℃、600rpm、1.0vvmの条件でさらに24時間反応させた。

【0077】反応終了後、反応混合液2mlを遠心分離にて除菌し、上澄液のロイシン酸の定量および光学純度の測定を行ったところ、光学純度100%eeの(D)ーロイシン酸が濃度2.0g/Lで残存していた。

【0078】反応終了後の反応混合液を遠心分離に供して菌体を除去し、上清液を限外ろ過膜(ミリポア社製、分子量1万カット)を通して高分子物質を除いた。透過液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、5N水酸化ナトリウムでpH11.0に調整し、ジエチルエーテル200mlを添加して、不純物を抽出除去した。次いで、水層のpHを塩酸にて1.5に調整した後、ジエチルエーテル200mlを添加して抽出した。有機層を減圧濃縮し、トルエンから晶析したところ、(D)ーロイシン酸の結晶530mgが得られた(化学純度99.6%、光学純度99%ee以上)。